Atti Soc. ital. Sci. nat. Museo civ. Stor. nat. Milano, - 125 (1-2): 121-131, 15-VI-1984

EMILIA WANDA CARONNA (*)

DATI PRELIMINARI SULL'EVOLUZIONE DELL'OSSIFICAZIONE EMBRIONALE IN *CLETHRIONOMYS GLAREOLUS* SCHR. (**)

(*Mammalia*)

Riassunto. — Mancano in bibliografia dati riguardanti lo sviluppo embrionale in natura in *Clethrionomys glareolus* Schr. A tale scopo sono state catturate femmine già gravide, di cui non era conosciuta la data di fecondazione. Dall'analisi dei cambiamenti della morfologia esterna, della comparsa e grado di ossificazione dei centri scheletrici, è stato possibile fissare un metodo valido al fine di determinare l'età gestazionale in embrioni di questo roditore.

Abstract. — *Preliminary data on embryonal ossification of Clethrionomys glareolus* Schr.

Prenatal development in litters of *Clethrionomys glareolus* Schr. from females trapped more pregnant, was investigated. It was possible to determine the age of the embryos throught the analysis of the external structures and development of the ossification centers. The data were compared with developmental levels described by other Authors.

Nell'ambito di una ricerca ambientalistica in una zona circostante la Centrale elettronucleare di Caorso, si è posto il problema di conoscere lo sviluppo embrionale normale in alcune nidiate di *Clethrionomys glareolus* Schr., per avere i dati necessari per un confronto con possibili malformazioni peri-natali e neo-natali, dovute ad effetti teratogeni dell'ambiente.

(*) Museo di Storia Naturale, Università, Via dell'Università 12, 43100 Parma.

(**) Ricerche condotte nell'ambito del programma del Gruppo Interdisciplinare di Radioecologia della Facoltà di Scienze dell'Università di Parma.

Questo tipo di ricerca si collega ad altre finalizzate alla caratterizzazione del sito nucleare di Caorso, nell'ambito del programma del Gruppo Interdisciplinare di Radioecologia della Facoltà di Scienze dell'Università di Parma (IANELLI *et al.*, 1979); l'interesse dei ricercatori nello studio di tali siti è d'altra parte ben noto (BLASI *et al.*, 1982). Ben poco, comunque, si conosce sul differenziamento del sistema scheletrico e sui tempi di comparsa dei centri di ossificazione negli embrioni di *C. glareolus*, in natura e nel territorio italiano.

OŻDŻENSKI e MYSTKOWSKA (1976) hanno descritto in uno stock di femmine una sequenza degli stadi di gravidanza e i cambiamenti che avvengono nella morfologia esterna dei feti, nel periodo compreso fra 9 giorni di gestazione e il parto che, secondo questi autori, avviene tra il 18° ed il 19° giorno dopo la presenza, nelle femmine accoppiate, del « tappo vaginale ».

Poiché era necessario calcolare lo stadio di gravidanza in femmine trappate già gravide, si è ritenuto opportuno utilizzare come confronto anche i lavori sullo sviluppo esterno di embrioni di coniglio e ratto (EDWARDS, 1968), sulla comparsa e l'evoluzione dei centri di ossificazione nello sviluppo embrionale nel topo albino di ceppo Swiss (RINALDI, 1968), nel ratto albino di ceppo Wistar (RINALDI, 1969) e nel ratto di ceppo Long-Evans (RINALDI *et al.*, 1980), anche se i dati si limitano a ceppi di laboratorio.

Sono state tenute poi in particolare considerazione le ricerche di ZEJDA (1968) su embrioni e neonati di *C. glareolus* e di ŠTĚRBA (1976) sullo sviluppo prenatale di roditori microtini. Quest'ultimo autore, utilizzando sia materiale embrionale e fetale trappato in 12 anni dallo staff del suo istituto, che dati bibliografici, analizza lo sviluppo prenatale in 5 specie di microtini ,fra cui il *C. glareolus*, prendendo in considerazione taglia, peso, struttura, alcuni caratteri esterni ed, infine, lo sviluppo dei sistemi scheletrici e muscolari. Il lavoro è finalizzato alla definizione di livelli successivi di sviluppo, correlati ai dati morfologici esterni, che permettono di determinare l'età degli embrioni, anche quando non è conosciuta la data dell'accoppiamento parentale. Štěrba, raggruppando tutti i dati in possesso, classifica gli embrioni in 9 livelli di sviluppo; inoltre riporta in tabelle, dettagliatamente, comparsa e sviluppo dei centri di ossificazione nello scheletro di *C. glareolus*, oltre che di altre specie, basandosi su alcune fasi di sviluppo dello scheletro di *Talpa europaea* Linn., durante il periodo prenatale (ŠTĚRBA, 1973; ŠTĚRBA & ZELENÝ, 1974, a-b; ŠTĚRBA, 1976).

Materiali e metodi.

Nel corso di questa ricerca sono state catturate, durante la stagione primaverile, tre femmine gravide di *C. glareolus*, in una stazione di ricerca situata presso una cascina adibita a deposito per la pioppicoltura, in un ambiente golenale del Po. Nel corso di tutta la ricerca sono stati trappati dal 6-1-1981 al 9-9-1981, 121 animali appartenenti a specie diverse (Tab. 1). Le femmine sono state narcotizzate e cesarizzate subito

TAB. 1. — Specie trappate nell'ambiente golenale del fiume Po. - A = prossime a corsi d'acqua; B = lontane da corsi d'acqua; i numeri indicano gli individui catturati.

	Stazioni A	Stazioni B
Clethrionomys glareolus Schr.	3	66
Apodemus sylvaticus L.	6	30
Rattus norvegicus Berk.	8	0
Erinaceus europaeus L.	0	6
Mustela nivalis L.	0	2

dopo la cattura; all'esame dell'utero nessuna presentava punti di riassorbimento o placente atrofizzate, e le ovaie presentavano l'aspetto tipico della gravidanza in corso. In particolare le placente di una femmina avevano una forma a « fungo » invece che a « focaccia » come le altre (Tab. 2).

TAB. 2. — Caratterizzazione delle femmine di *C. glareolus* Schr., trappate già gravide.

N. femmina	Data cattura e cesarizzazione	N. totale embrioni	Utero Branca Dx.	Utero Branca S.	Forma placenta
1°	19-4-1981	6	3	3	a « focaccia »
2°	23-4-1981	4	3	1	a « focaccia »
3°	21-5-1981	5	2	3	a « fungo »

Subito dopo il prelievo gli embrioni sono stati siglati individualmente, anche in rapporto alla loro posizione nella branca dell'utero; prima osservati al binoculare per la descrizione della morfologia esterna, sono stati quindi eviscerati e fissati in alcool 95°. Dopo una settimana sono stati tenuti per 24 ore in acetone assoluto e, successivamente, per un altro

giorno in soluzione acquosa di KOH (1-2%, in rapporto alla taglia individuale), a cui è stata aggiunta una soluzione di Red-Alizarina allo 0,01% fino ad ottenere una colorazione rosso-violetto; ciò per permettere contemporaneamente la macerazione dei tessuti e la colorazione dello scheletro osseo.

Lavati accuratamente in acqua corrente, sono stati poi immersi per 48 ore in miscela di alcool 70°, glicerina pura ed alcool benzilico, proporzione 2:2:1, per la chiarificazione. Conservati in miscela di alcool 70° e glicerina in parti uguali, sono stati osservati singolarmente al binoculare per la descrizione delle ossa, registrando tutte le caratteristiche osservate.

I *Clethrionomys* catturati sono stati stabulati per osservare il comportamento riproduttivo. In una delle gabbie contenente una coppia di *Clethrionomys* è avvenuto di notte un parto di due piccoli che hanno subíto tentativi di cannibalismo da parte dei genitori. Poiché le parti mancanti erano « molli » e dato che i piccoli avevano una età sicuramente non superiore a 12 ore di vita, sono stati prelevati e sottoposti allo stesso metodo di colorazione e chiarificazione, per ottenere un valido parametro di confronto con i « cesarizzati », la cui età poteva d'altra parte essere presunta solo in rapporto alle dimensioni dell'utero delle rispettive madri.

Per tutti i « cesarizzati » sono stati registrati i dati riguardanti lo scheletro intero, per i « cannibalizzati » solo quelli relativi alle ossa necessarie per fissare una corrispondenza fra grado di sviluppo ed età di 12 ore.

Risultati.

Nell'ambito di ciascuna nidiata sono stati osservati, oltre alla morfologia esterna:

— la presenza di centri di ossificazione (C.O.) nel modello scheletrico;
— il grado di ossificazione relativo all'individuo;
— la posizionalità di ogni singolo osso, i contatti e le sovrapposizioni tra i vari centri e, in particolare, di quelli del cranio.

Sono stati analizzati per primi i « cannibalizzati », di cui riportiamo i dati in modo particolareggiato.

CANNIBALIZZATI: *Morfologia esterna* - Non è stato possibile farne una descrizione, dato che erano rovinati esternamente e in vaste zone la pelle era stata strappata al punto tale da rendere visibili i tessuti sottostanti.

Esame dello scheletro - Il cranio, pur non presentando accenni di sutura, presenta tutte le ossa, con varie sporgenze e già in contatto o soltanto sovrapposte nei margini, sia nella volta che nei lati; non è ancora perfettamente definita la fontanella anteriore o bregmatica. Lo squamoso è più denso nella porzione centrale del corpo da cui si dipartono le trabecole ossee per i contatti con le ossa circostanti. La spina del temporale è un centro ancora separato dal corpo, mentre il processo zigomatico, che è stretto, comincia a rapportarsi, con esili filamenti ossei allo zigomatico, particolarmente sottile. La mandibola, snella e assottigliata nei condili, ha l'aspetto e la forma definitiva, dovuta alla fusione dei vari C.O.; le branche anteriori sono fuse e delimitano il forame mentoniero. La bolla timpanica è molto grande rispetto al cranio ed ossificata in corrispondenza dell'anello timpanico e degli ossicini dell'orecchio medio.

La scapola, anch'essa nella sua forma definitiva, presenta la spina lunga ed espansa, con il processo acromiale ravvicinato alla clavicola. La ossificazione del corpo è nettamente più arretrata rispetto a quella della spina.

Nello sterno sono presenti 6 sternebre, e, in particolare la 5ª presenta ancora i 2 C.O. separati fra di loro.

Nelle zampe anteriori sono ben ossificate le metacarpali, le I falangi dal 2° al 5° dito e le III falangi in tutte. A livello delle II si distingue un notevole addensamento di cartilagine.

Nelle zampe posteriori sono ossificate le metatarsali, tutte le I falangi e le ultime; un anello ossificato esiste anche per le II falangi nel 3°, 4° e 5° dito. E' presente inoltre un C.O. ben ossificato e a cilindro, a livello del calcagno; è stato definito e riconosciuto come tale dalla sua posizione rispetto alla fibula.

Cesarizzati: Le tre nidiate sono state osservate e dal confronto con i « cannibalizzati » risultano avere una età di gestazione compresa fra 19 e 20 giorni circa. Poiché presentavano fra di loro alcune differenze sia nella morfologia esterna che nello scheletro, sono state ordinate in tale successione:

A) Età fra 19 giorni e 19-1/2 - Femmina N° 1;

B) Età di poco più di 19 giorni e 1/2 - Femmina N° 2;

C) Età di 20 giorni circa - Femmina N° 3.

A) *Morfologia esterna* - La pelle si presenta liscia e senza cenni di follicoli piliferi. Gli occhi, sporgenti, non mostrano rima o fessura palpebrale. I padiglioni auricolari non sono ancora sollevati. La testa è piuttosto grossa rispetto al resto ed è molto sporgente nella regione del sovraoccipitale. Le zampe appaiono poco articolate.

Esame dello scheletro - Le ossa della volta cranica sono separate da una larga fessura, mentre si nota un avvicinamento fra parietale ed interparietale. Il temporale presenta un secondo processo posteriore che sembra essersi originato separatamente con un C.O. largo ed espanso, reticolarspugnoso ed unirsi successivamente alla squama con un « peduncolo » osseo appiattito. Comincia ad abbassarsi il processo coracoideo nella scapola e le costole sono ossificate solo nelle diafisi.

Lo sterno è costituito ancora dai C.O. delle sternebre, in successione: 1°-6°-2°-3°-4°, mentre quelli della 5° non sono visibili.

Le zampe anteriori presentano l'ossificazione nelle diafisi delle ossa lunghe e negli abbozzi dei rispettivi processi, mentre non si distinguono i C.O. del carpo, delle I e delle II falangi. Sono invece ben evidenti i C.O. delle metacarpali e le ultime falangi sono ricoperte dalle unghie.

Le zampe posteriori presentano una situazione ossea simile a quella delle anteriori, in più solo cenni nelle III falangi.

Nelle vertebre si osservano i C.O. dei corpi vertebrali e degli archi neurali separatamente a livello dalla 1ª cervicale alla 3ª caudale; solo in alcuni embrioni è chiaramente visibile anche il disco vertebrale della 4ª e 5ª caudale.

Per le altre due nidiate vengono riportate solo le differenze rispetto alla nidiata A.



Fig. 1. — Comparsa dei centri di ossificazione delle sternebre in *Clethrionomys glareolus* Schr. (Forme tratteggiate: centri cartilaginei con inizio di ossificazione; forme piene: centri ben ossificati).

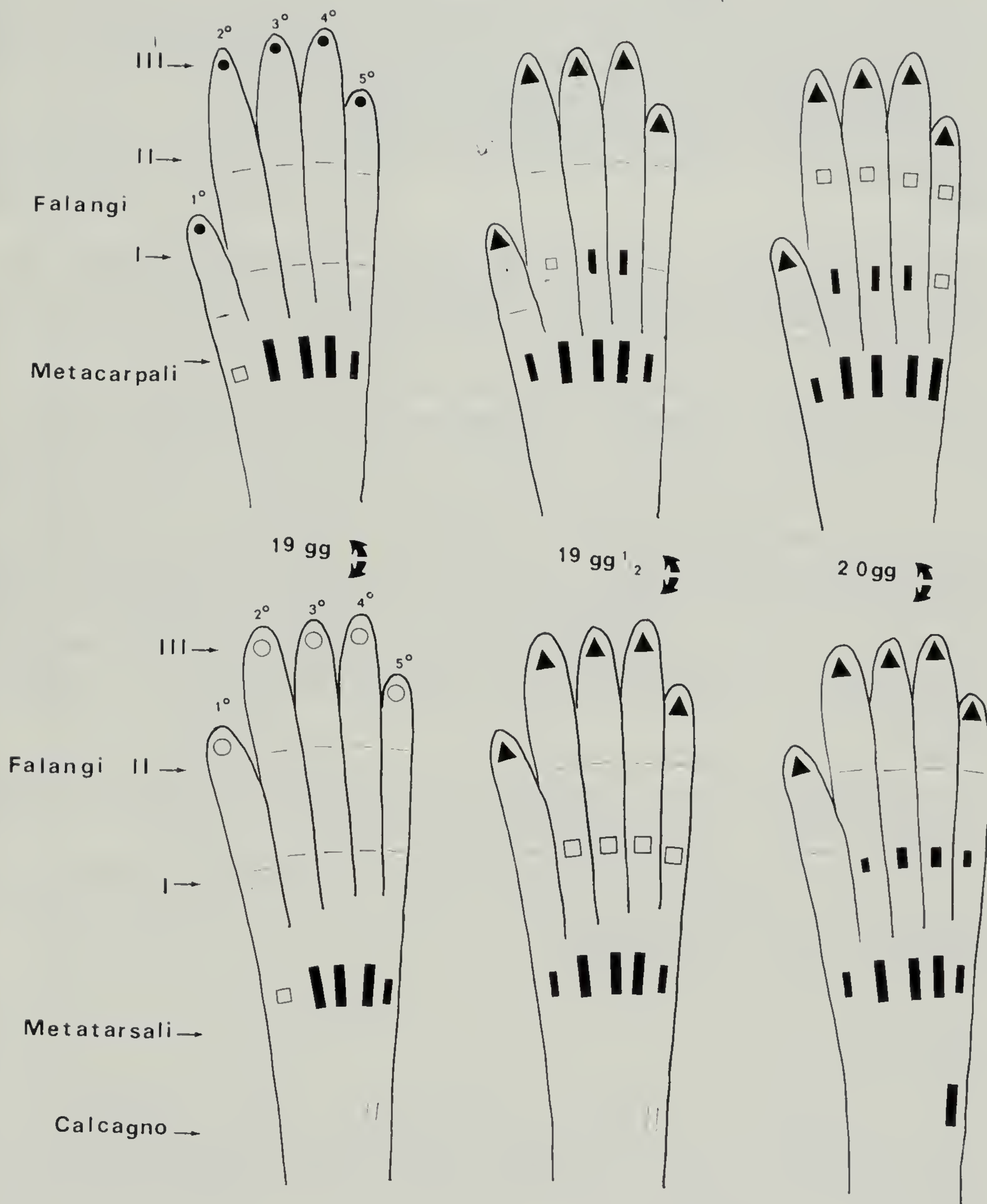


Fig. 2. — Comparsa dei centri di ossificazione in embrioni di *Clethrionomys glareolus* Schr. (—: Centri cartilaginei; segno vuoto: comparsa dei C.O.; segno pieno: centri ben ossificati.

B) *Morfologia esterna* - Nessuna differenza.

Esame dello scheletro - Sono comparsi i C.O. delle I falangi nel 3° e 4° dito e l'astuccio diafisario del metacarpale nel 1° dito delle zampe anteriori, mentre nelle posteriori compaiono il metatarsale del 1° dito, le I falangi nel 3°-4°-5° dito e si ossificano di più le III.

La colonna vertebrale, pur presentando gli stessi C.O. della nidiata precedente, ha già i C.O., separati, dei processi trasversi nelle prime caudali.

C) *Morfologia esterna* - Gli embrioni hanno le pieghe nella pelle, che è rugosa, presentano le vibrisse, il padiglione auricolare ben sollevato, e le zampe anteriori con l'articolazione ben definita.

Esame dello scheletro - Il cranio presenta alcune differenze con le nidiate precedenti, ma anche molte delle caratteristiche dei « cannibalizzati ». Compaiono connessioni fra le ossa, la base ossea della bolla timpanica, si accentua di più l'angolo fra interparietale e sovraoccipitale. Nello sterno sono evidenti i due C.O. della 5ª sternebra, che sono perpendicolari all'asse cefalo-caudale, contrariamente agli altri che invece compaiono e si mantengono in posizione parallela all'asse scheletrico. Nelle zampe manca solo il C.O. della falange del 1° dito e quelli presenti da prima si vanno allungando; in particolare, nelle posteriori si evidenzia il calcagno.

In tutti gli embrioni le vertebre sono ossificate fino alla 5ª caudale e le connessioni fra corpi vertebrali e rispettivi archi neurali iniziano solo nelle 4 sacrali e nelle prime caudali.

In fig. 1 e 2, sono riportati gli schemi sulla comparsa e sulle successione dei C.O., rispettivamente nello sterno e nelle zampe degli embrioni delle nidiate e dei « cesarizzati ».

Conclusioni.

Il basso numero di nidiate non permette conclusioni definitive, tuttavia ha permesso di trarre rilevazioni di carattere riproduttivo ed embriologico, in una specie sulla quale si avevano così scarse conoscenze, riguardo l'argomento.

Innanzi tutto, dal lavoro svolto in parallelo sulle osservazioni del comportamento riproduttivo, è stato possibile stabilire che la durata delle gestazioni in *Clethrionomys glareolus* è di poco più di 20 giorni, dato in parziale disaccordo con i 18-19 giorni riportati da OŻDŻEŃSKI & MYSTKOWSKA (1976), e con altre riportate in letteratura. Per quanto riguarda

l'esame della morfologia esterna degli embrioni, si può affermare, in accordo con la maggior parte degli Autori, che si sono occupati del problema, che le variazioni di alcune specifiche regioni in un embrione possono rappresentare validi parametri sia per definire in linea di massima l'età gestazionale che per stabilire gli stadi di sviluppo di embrioni di cui non si conoscono le date di accoppiamento o di fecondazione materna.

In tab. 3, vengono riportati i parametri scelti e messi a confronto con quelli di EDWARDS (1968), tenendo naturalmente conto che l'autore si riferisce a ratti di laboratorio.

TAB. 3. — Comparsa di alcuni elementi nella morfologia esterna, rispettivamente in embrioni di ratto di laboratorio (da Edwards, 1968) e di *Clethrionomys glareolus* Schr.

	Embrioni di Ratto	Età di gestazione	Embrioni di *C. glareolus*	Età di gestazione
Vibrisse	4 papille sul muso	14,5-15 gg. Stadio 7	2 serie di papille sul muso	20 gg.
Padiglione orecchio	Comincia a coprire il meato acustico	14,5-15 gg. Stadio 7	Presente, ripiegato; sollevato	19-19,5-20 gg.
Fessura palpebrale	Si restringe per l'accrescimento delle palpebre	16,5-17 gg. Stadio 10	Assente	20 gg.
Unghie	Presenti in zampe anteriori e posteriori	18-18,5 gg. Stadio 12	Presenti	19-19,5 gg.

Un confronto particolarmente approfondito con la ricerca di ŠTĚRBA, (1976), ha da una parte convalidato le nostre osservazioni sui caratteri esterni degli embrioni, dall'altra ha messo in rilievo alcune caratteristiche differenziali sulla comparsa ed evoluzione dei C.O. nello scheletro. Per quanto riguarda il primo punto, Štěrba classifica gli embrioni in 9 livelli di sviluppo, in rapporto a diversi parametri, fra cui anche quelli da noi scelti e considerati. In particolare, il suo 8° livello, che corrisponde ad una età gestazionale di 18,5-19 giorni, è caratterizzato da « Pelle ripiegata in numerose pieghe » ed il 9°, che corrisponde ad una età gestazionale di 20 gg. è caratterizzato da « Eruzione di peli tattili sulle labbra ».

Pertanto le nostre nidiate possono essere classificate fra l'8° ed il 9° livello; e ciò può essere considerata una verifica della validità del metodo per individuare alcuni caratteri della morfologia esterna per una buona datazione di embrioni di età gestazionale sconosciuta. Per quanto riguarda

poi il secondo punto, sono state trovate delle differenze nell'ordine di comparsa dei C.O. nello scheletro degli embrioni: alcune abbastanza prevedibili, altre di notevole interesse.

I tempi di comparsa dei centri nelle zampe, sia anteriori che posteriori, sono differenti dai dati della bibliografia in questione. Una particolare e grossa diversità esiste fra il numero di sternebre: Štěrba descrive in un embrione la comparsa della 1ª, ed in un altro la comparsa di altre tre sternebre.

Sia in *Clethrionomys* che in tutti gli altri roditori da noi studiati negli anni, sono sempre stati trovati 6 C.O. nello sterno. Nei *Clethrionomys*, in particolare, l'ultima a comparire è la 5ª; si ritiene che queste ultime differenze siano causate dalla diversità di origine del materiale usato da noi e da Štěrba.

L'esame, sia dello sviluppo esterno che interno, conferma che negli animali selvatici si riscontra, all'interno di ogni singola nidiata, omogeneità, e nei tempi, e nell'ordine di successione dei C.O., e ciò contrariamente a quanto si trova negli animali di laboratorio.

L'ossificazione dei centri nel cranio si è presentata particolarmente interessante: abbiamo osservato un secondo C.O., mai riscontrato in altri roditori, a livello del processo posteriore del temporale e che si origina separatamente e che successivamente si unisce alla squama per mezzo di un « peduncolo osseo », come osservato nei « cannibalizzati ».

Altre considerazioni riguardano la struttura del cranio, che è particolarmente robusta. La disposizione dei C.O. nella regione posteriore, è caratterizzata dall'angolatura fra interparietale e sovraoccipitale, premessa per la definizione della scatola cranica a profilo nettamente piegato verso il basso e posteriormente, tipica degli Spalacidi, ad abito fossorio ed ipogeo.

Nei « cannibalizzati », poi, i C.O., non ancora suturati, presentano protuberanze e forti rilievi per le inserzioni muscolari, caratteristica della sottofamiglia delle Microtinae, cui appartiene *Clethrionomys glareolus* Schr.

Un'ultima osservazione va fatta sulla presenza, nelle zampe posteriori del C.O. del calcagno, già in perfetto allineamento con la fibula e presente allo stadio embrionale. Tale centro, nei ratti di laboratorio, compare sempre almeno 24 ore dopo la nascita (Rinaldi, 1969).

In definitiva sembra di poter concludere che i processi di ossificazione in *Clethrionomys glareolus* Schr., pur rientrando nello schema noto per altri roditori, presentano alcuni aspetti originali forse da attribuire all'adattamento alla vita ipogea.

BIBLIOGRAFIA

BLASI C., FASCETTI S., CAVEDON G., CRISTALDI M., LOMBARDI BOCCIA G. & PARISI V., 1982 - Valutazione di impatto ambientale nei siti nucleari. - *Acqua e aria*, Milano, 3: 265-300.

EDWARDS J. A., 1968 - The external development of the rabbit and rat embryos. - *Advan. Terat.*, 3: 239-263.

IANELLI S., MEZZADRI M. G., PARISI V. & POLI P., 1979 - Ricerche radioecologiche nel sito nucleare di Caorso. - *Atti XXI Congresso Nazionale A.I.R.P.*, Palermo, 16-19 Ottobre, 1: 125-132.

ŻDZEŃSKI W. & MYSTKOWSKA E. T., 1976 - Stages of Pregnancy of the Bank Vole. - *Acta Theriol.*, 21, 20: 279-286.

RINALDI L., 1968 - Comparsa ed evoluzione dei centri di ossificazione nel corso dello sviluppo embrionale del topo albino (*Mus musculus* L.) - *Istituto Lombardo* (*Rend. Sc.*), Milano, B, 102: 243-262.

RINALDI L., 1969 - L'ossificazione embrionale nel ratto albino. - *Ateneo Parmense* (*Acta Bio-med.*), Parma, 40: 309-330.

RINALDI L., CINQUETTI R., CARONNA E. W. & LANZI S., 1980 - Ossificazione nel ratto di ceppo Long-Evans. Evoluzione in fase fetale avanzata e sensibilità a variazioni ambientali. - *Ateneo Parmense* (*Acta naturalia*), Parma, 16:127-135.

ŠTĚRBA O., 1973 - Developmental anatomy of the mole, *Talpa europaea* Linnaeus, 1758. IV. Developmental phases of the axial skeleton during prenatal period. - *Zool. Listy*, 22: 342-346.

ŠTĚRBA O. & ZELENÝ J., 1974 a - Developmental anatomy of the mole, *Talpa europaea* Linnaeus, 1758. V. Phases in the prenatal development of musculature of the pelvic limb. - *Zool. Listy*, 23: 47-52.

ŠTĚRBA O. & ZELENÝ J., 1974 b - Developmental anatomy of the mole, *Talpa europaea* Linnaeus, 1758. VI. The phases in prenatal development of skeleton of the pelvic limb. - *Zool. Listy*, 23: 107-111.

ŠTĚRBA O., 1976 - Prenatal Development of Microtine Rodents. - *Acta Sc. Nat.*, Brno, 10: 1-41.

ZEJDA J., 1968 - A Study on Embryos and Newborns of *Clethrionomys glareolus* Schreb. - *Zool. Listy*, 17: 115-126.